

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. Februar 2001 (01.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/07631 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/54**,
9/10, 1/21, C12P 19/44, A61K 31/7028 // (C12N 1/21,
C12R 1:19)

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **STÖCKIGT, Joachim**
[DE/DE]; Königsbergerstrasse 74a, D-55268 Nieder-Olm
(DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/02514

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Juli 2000 (27.07.2000)

(74) Anwälte: **BETTENHAUSEN, Berthold** usw.; Dehmel &
Bettenhausen, Müllerstrasse 1, D-80469 München (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

(30) Angaben zur Priorität:
199 35 140.6 27. Juli 1999 (27.07.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF
AKTIEN** [DE/DE]; Henkelstrasse 67, D-40589 Düssel-
dorf (DE).

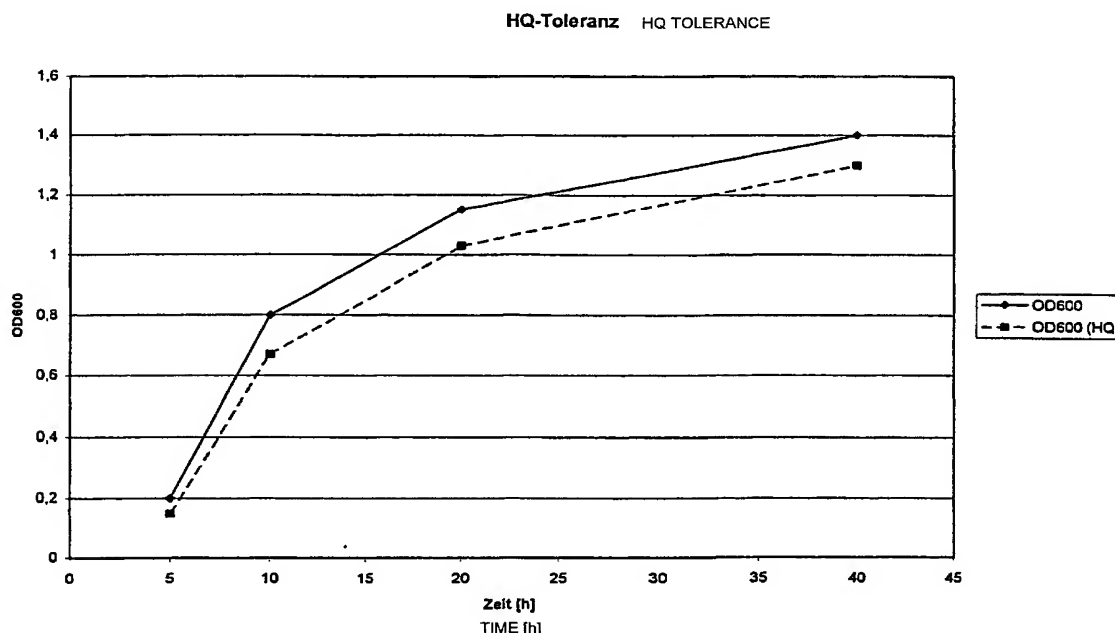
Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: NOVEL GLYCOSYLTRANSFERASE, THE PRODUCTION THEREOF AND ITS USE

(54) Bezeichnung: NEUE GLYKOSYLTRANSFERASE, IHRE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG



(57) Abstract: The invention relates to a nucleic acid sequence according to SEQ ID NO:1 or to its derivative or fragment or the variants of the nucleic acid sequence according to SEQ ID NO:1 or to a derivative or fragment of the variants, which codes a polypeptide with the biological activity of an arbutin synthesis, and to a polypeptide coded by these nucleic acid sequences. The invention also relates to a method for producing the inventive polypeptides and to a method for producing glycosides.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/07631 A2



Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1 oder deren Derivat oder Fragment oder die Variante der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1 oder ein Derivat oder Fragment der Variante, codierend ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Arbutin-Synthase sowie ein von diesen Nukleinsäuresequenzen codiertes Polypeptid. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Polypeptide sowie ein Verfahren zur Herstellung von Glykosiden.

5

Neue Glykosyltransferase, ihre Herstellung und Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1 oder deren
10 Derivat oder Fragment oder die Variante der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1 oder ein
Derivat oder Fragment der Variante, codierend ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität
einer Arbutin-Synthase sowie ein von diesen Nukleinsäuresequenzen codiertes Polypeptid. Die
Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Polypeptide
sowie ein Verfahren zur Herstellung von Glykosiden.

15

Glykosyltransferasen sind wichtige Enzyme in pflanzlichen Zellen, wo sie für die Entgiftung der
Zelle verantwortlich sind z.B. durch Überführung toxischer Verbindungen in gut akkumulierbare
vakuoläre kompartmentierte Glykoside. Das Glykosid Arbutin ist im Pflanzenreich
insbesondere verbreitet in Ericaceae, z.B. in der Bärentraube *Arctostaphylos uva-ursi* und der
20 Preiselbeere *Vaccinium vitis-idaea*, in Saxifragaceae z.B. *Bergenia crassifolia*, aber auch in
Chimaphila umbellata (Walddolde), *Origanum majorana* (Majoran) oder Blättern des
Birnbauums. Wegen seiner antibakteriellen Wirkung wird es z.B. in Form von Teeaufgüssen bei
Entzündungen der Harnwege eingesetzt. Das Glykosid ist auch in der Lage, das Enzym
Tyrosinase, welches einen wichtigen Schritt in der Melaninbiosynthese katalysiert, *in vivo* zu
25 inhibieren. Das Glykosid ist von biotechnologischem Interesse, da es in Japan in beträchtlicher
Menge (1-2 t pro Jahr) in kosmetischen Zubereitungen aufgrund seiner hautaufhellenden
Wirkung, bedingt durch die Inhibierung der Melaninbiosynthese, verwendet wird. Während im
europäischen Markt die Arbutin enthaltenden Zubereitungen vorwiegend bei Altersflecken,
Leberflecken oder Sommersprossen eingesetzt werden, sollen im asiatischen Markt die
30 Schönheitsideale einer hellen makellosen Haut durch ganzkörperliche Behandlung mit Arbutin
enthaltenden Zubereitungen erreicht werden; vgl. Blume G., Teichmüller E., Orndorff S., (1999),
SÖFW-Journal 2/3, 20-24.

Glykosid ist die Sammelbezeichnung für eine umfangreiche Gruppe von Pflanzenstoffen und
35 synthetischen Verbindungen, die aus ein oder mehreren Kohlenhydraten (Mono- bzw.
Oligosaccharide) und ein oder mehreren Aglykonen, d.h. Nichtzuckern, bestehen. In den

Glykosiden ist das Aglykon, das auch Genin genannt wird, durch ein Sauerstoff-Atom in einer hier glykosidischen Bindung genannten Ether-Bindung an ein Halbacetal-C-Atom des Kohlenhydrats gebunden.

- 5 Die Herstellung und Aufreinigung von Arbutin durch Isolierung aus den genannten Arbutin enthaltenden Pflanzen oder durch Umsetzung von Hydrochinon mittels Pflanzenzellen ist bekannt; vgl. z.B. Lutterbach R., Stöckigt J., (1992), High yield formation of arbutin from hydrochinon by cell-suspension cultures of *Rauwolfia serpentina*, *Helv. Chim. Acta*, 75, 2009 – 2011. Allerdings haben diese Verfahren große Nachteile: Da Arbutin ein intrazelluläres Produkt
10 ist, ist die Aufreinigung mit enormem Aufwand verbunden und die Ausbeute niedrig. Daneben können aus Pflanzen nur natürlich vorkommende Glykoside wie z.B. Arbutin erhalten werden. Es besteht aber ein großer Bedarf an gezielt hergestellten neuen Glykosiden. Enzymatische *in-vitro*-Verfahren zur Herstellung von Glykosiden sind üblicherweise auf Alkylglycoside beschränkt und zeigen für aromatische Glykoside sehr geringe Ausbeuten, die geringer als 10%
15 betragen; vgl. Vic G., Thomas D., Crout D.H.G., (1997), Solvent effect on enzyme-catalyzed synthesis of β -D-glucosides using the reverse hydrolysis method: Application to the preparative-scale synthesis of 2-hydroxybenzyl and octyl β -D-glucopyranosides. *Enzyme Microb. Technol.* 20:597-603; Vic G., Biton J., Le Beller D., Michel J.M., Thomas D., (1995), Enzymatic glucosylation of hydrophobic alcohols in organic medium by the reverse hydrolysis reaction
20 using almond- β -D-glucosidase. *Biotechnol. Bioeng.* 46:109-116.

- Ein weiteres Herstellungsverfahren von Glykosiden besteht in der chemischen Darstellung von Glykosiden ausgehend von ungeschützten Zuckern. Das chemische Herstellungsverfahren führt aber üblicherweise zu unspezifischen Gemischen aus ein- und mehrfach alkylierten Zuckern, so
25 daß die Einführung und Entfernung von Schutzgruppen notwendig ist, wenn ein bestimmtes Produkt gezielt synthetisiert werden soll. Durch die Verwendung aktivierter Derivate wie Alkohol-HCl entstehen häufig unerwünschte Nebenprodukte, welche die Umwelt belasten, die Aufarbeitung erschweren und die Ausbeuten des gewünschten Produkts vermindern.

- 30 Es besteht somit der Bedarf nach einem effizienten und einfachen Herstellungsverfahren für Glykoside. Ferner besteht ein Bedarf nach einem Herstellungsverfahren für eine Glykosyltransferase, die zur Herstellung der Glykoside verwendet werden kann.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung wird durch den in den Patentansprüchen definierten Gegenstand gelöst.

Der hier verwendete Ausdruck "Variante" bezeichnet ein zu einer ersten Nukleinsäuresequenz homologes Gen. Homolog bedeutet, daß das Gen allelisch sein kann. Homolog bedeutet ferner, daß das Gen aus einer anderen Species stammen kann, das von diesem Gen codierte Polypeptid aber die gleiche biologische Aktivität besitzt wie das von der ersten Nukleinsäuresequenz codierte Polypeptid.

10 Der hier verwendete Ausdruck "Derivat" bezeichnet eine Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenz, die durch Modifikation von einer anderen Sequenz abgeleitet ist. Die Modifikation umfaßt die Deletion, Addition, Substitution, Insertion oder Inversion von Nukleotiden bzw. Aminosäuren an einer oder mehreren Stellen der anderen Sequenz.

15 Der hier verwendete Ausdruck "Fragment" bezeichnet ein durch Deletion an einer oder mehreren Stellen erzeugtes Teilstück einer Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenz.

Der hier verwendete Ausdruck "hybridisieren" umfaßt stringente und wenig stringente Hybridisierungsbedingungen, wie sie z.B. in Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory (1989), ISBN 0-87969-309-6 beschrieben sind. Ein Beispiel für stringente Hybridisierungsbedingungen ist: Hybridisierung in 4 x SSC bei 65°C mit anschließenden 2-3 Waschschritten in 0,1 x SSC bei 65°C für insgesamt etwa eine Stunde. Ein Beispiel für wenig stringente Hybridisierungsbedingungen ist: Hybridisierung in 4 x SSC bei 37° C, gefolgt von 2-3 Waschschritten in 1 x SSC bei Raumtemperatur.

25

Der hier verwendete Ausdruck "Vektor" bezeichnet natürlich vorkommende oder künstlich hergestellte Konstrukte zur Aufnahme, Vermehrung, Expression oder Überführung von Nukleinsäuren, z.B. Plasmide, Phagemide, Cosmide, künstliche Chromosomen, Bakteriophagen, Viren oder Retroviren.

30

Der hier verwendete Ausdruck "Transformation" oder "transformieren" bezeichnet jegliche Überführung einer Nukleinsäuresequenz in eine Zelle. Die Überführung kann z.B. eine Transfektion oder Lipofektion sein oder durch das Calcium-Verfahren oder Elektroschock-Verfahren durchgeführt werden. Der Ausdruck bezeichnet daher nicht nur das Verfahren, das

üblicherweise unter dem Begriff Transformation verstanden wird.

Die Erfindung wird durch die folgenden Figuren erläutert.

- 5 Figur 1 ist eine schematische Wachstumskurve, die die Toleranz von rekombinanten *E. coli* (transformiert mit der erfindungsgemäßen Glykosyltransferase-cDNA) gegenüber Hydrochinon in der Kulturbrühe darstellt. Die gestrichelte Linie (---■---) zeigt das Wachstum von rekombinanten *E. coli* in Gegenwart von Hydrochinon, die durchgezogene Linie (—◆—) zeigt das Wachstum von rekombinanten *E. coli* ohne Hydrochinon. HQ bedeutet Hydrochinon.
- 10 OD600 bedeutet optische Dichte bei 600 nm.

Figur 2 ist eine schematische Darstellung der Arbutin-Synthase-Ausbeute, die mit rekombinanten *E. coli* (transformiert mit der erfindungsgemäßen Glykosyltransferase-cDNA) erzielt wurde.

15

- Die vorliegende Erfindung betrifft Glykosyltransferasen, besonders Glucosyltransferasen, insbesondere Arbutin-Synthasen. Ein Aspekt der Erfindung betrifft eine Nukleinsäuresequenz, die ein Polypeptid codiert, das in *Rauwolfia serpentina* die Umsetzung von Hydrochinon und Glucose zu Arbutin katalysiert. Eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz ist in SEQ ID
- 20 NO:1 aufgeführt. Ferner betrifft die Erfindung die Derivate oder Fragmente der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1. Ferner betrifft die Erfindung die Varianten der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1, die ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Arbutin-Synthase codieren. Ein weiterer Aspekt betrifft Derivate und Fragmente der Varianten der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1, solange die Derivate und Fragmente
- 25 ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Arbutin-Synthase codieren. Besonders betrifft die Erfindung die Nukleinsäuresequenzen der Varianten und deren Derivate und Fragmente, die mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz hybridisieren. Die Hybridisierung kann unter stringenten bis zu weniger stringenten Bedingungen durchgeführt werden.

30

Varianten der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz, die ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Arbutin-Synthase codieren, können aus allen Organismen stammen. Die Varianten können insbesondere aus *Rauwolfia serpentina*, aus Ericaceae z.B. aus der Bärentraube *Arctostaphylos uva-ursi* und der Preiselbeere *Vaccinium vitis-idaea*, aus Saxifragaceae z.B. aus

Bergenia crassifolia, aus *Chimaphila umbellata* (Walddolde), aus *Origanum majorana* (Majoran) oder aus dem Birnbaum stammen. Ferner betrifft die Erfindung Derivate und Fragmente der Varianten.

- 5 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen können natürlichen Ursprungs oder synthetisch hergestellt worden sein. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen können z.B. zur Identifizierung und Isolierung von zur Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1 homologen Genen in anderen Organismen oder von homologen Genen in *Rauwolfia serpentina* mit Hilfe von Hybridisierungs- oder Screening-Verfahren verwendet werden, z.B. als Sonde für das
- 10 Screening in DNA-Bibliotheken.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen können in Vektoren, z.B. Expressionsvektoren eingebaut werden, die dann in eine geeignete Wirtszelle überführt werden. Die Zellen exprimieren dann das von einer oder mehreren der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen

15 codierte Polypeptid. Geeignete Wirtszellen können Mikroorganismen wie Bakterien, z.B. *E. coli*, oder Hefen, oder tierische Zellen, z.B. Insektenzellen, oder pflanzliche Zellen, z.B. Algen, sein. Die für den Einbau der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen und die Überführung in die Wirtszellen in Frage kommenden Vektoren sind dem Fachmann bekannt. Ferner können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen in das Genom der Wirtszellen durch homologe oder

20 illegitime Rekombination mit Hilfe von Rekombinationselementen integriert sein. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen können durch Modifikationen z.B. Substitution von bestimmten Nukleotiden an die jeweilige Wirtszelle angepaßt werden, um eine für die Wirtszelle geeignete Expression zu gewährleisten.

- 25 Die Erfindung betrifft ferner die durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen codierten und exprimierten Polypeptide. Besonders betrifft die Erfindung das Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 oder dessen Derivat oder Fragment. Insbesondere betrifft die Erfindung Polypeptide, deren Aminosäuresequenzen zur Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 eine Identität von 60% oder mehr besitzen. Bevorzugt sind Polypeptide mit einer
- 30 Identität von 80% oder mehr, insbesondere bevorzugt sind Polypeptide mit einer Identität von 90% oder mehr.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Polypeptide, umfassend die folgenden Verfahrensschritte: Geeignete Wirtszellen, z.B.

Mikroorganismen, tierische Zellen oder pflanzliche Zellen, werden mit einer oder mehreren der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen transformiert. Die Nukleinsäuresequenz kann in einen Expressionsvektor integriert sein, der nach der Transformation episomal in der Zelle vorliegt. Andererseits kann die Nukleinsäuresequenz mit Transkriptionselementen funktional verbunden sein und nach Einführung in die Wirtszelle in das Genom integriert sein. Nach der Transformation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz(en) wird die Zelle in einem entsprechenden Kulturmedium, das der Fachmann für die jeweilige Wirtszelle im Stand der Technik leicht findet, kultiviert und vermehrt.

Die transformierte Zelle kann ferner Selektionsmarker umfassen, die z.B. auf dem transformierten Vektor vorliegen können. Selektionsmarker können auch mit einer oder mehreren der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen cotransformiert werden oder mit einer der Nukleinsäuresequenzen zusammenhängen und ins Genom integrieren. Ferner können andere üblicherweise verwendete Selektionsverfahren verwendet werden.

Nach Isolierung der vermehrten Zellen wird das von der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz codierte und exprimierte Polypeptid aus den Zellen durch übliche Verfahren isoliert und aufgereinigt.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können zur Herstellung von Glykosiden verwendet werden. Die zur Herstellung der Glykoside verwendeten Aglykon-Substrate können Alkyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkylalkyl-, Aalkyl- oder Arylalkohole mit 1 bis 26 C-Atomen und 0 bis 10 Heteroatomen sein, die unverzweigt oder verzweigt, einfach oder mehrfach ungesättigt sein können und Substituenten, z.B. Hydroxy-, Halogen- Amino- oder Nitro-Reste, am Kohlenstoffgerüst und/oder den Heteroatomen tragen können. Bevorzugte Aglykone sind aromatische Alkohole, z.B. Hydrochinon, Vanillin, p-Nitrophenol, β -Naphthol, Thymol, Methoxyphenol, Resorcin, Phenol, Hydroxyacetophenon, Niclosamid, Dimethoxymethylhydrochinon, Flavonoide, Flavone, Catechol, Catechine, Anthocyanidine, Gallussäure und Tannine. Besonders bevorzugt ist Hydrochinon. Die zur Herstellung der Glykoside verwendeten Kohlenhydrat-Substrate sind Zucker mit einer Halbacetal-bildenden Carbonylgruppe und mehreren Hydroxygruppen im Molekülrest. Bevorzugte Zucker sind Glucose, Fructose, Galactose, Mannose, Lactose und Maltose. Besonders bevorzugt ist Glucose.

Ferner können für die Herstellung von Glykosiden verwendet werden a) Substrate, deren Toxizität gegenüber dem Wirtsorganismus für eine *in vivo* Umsetzung (d.h. direkter Zusatz der Aglykone zur Kulturbrühe) zu hoch ist, b) Aglykone, die durch den verwendeten Wirtsorganismus selbst verstoffwechselt würden, c) Glykoside, die im Wirtsorganismus
5 verändert oder abgebaut würden, bzw. toxisch wirken.

Die Herstellung von Glykosiden, besonders von Glucosiden, kann sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durchgeführt werden. Das erfindungsgemäße Polypeptid kann nach Herstellung und Aufreinigung z.B. in einem Reaktionsgefäß auf ein oder mehrere Aglykone und ein oder mehrere
10 Zucker einwirken. Andererseits kann der Zelle, die mit einer oder mehreren der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen transformiert wurde, das Aglykon und gegebenenfalls der Zucker ins Kulturmedium gegeben werden, so daß das Glykosid in der Zelle hergestellt wird. Bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem das hergestellte Glykosid exkretiert wird, so daß es aus dem Kulturmedium isoliert werden kann.

15 Ferner können Glykoside unter Verwendung des erfindungsgemäßen Polypeptids in Matrixfixiertem Zustand in einem "Eintopf-Verfahren" bzw. "one step process" zur Glykosidherstellung unter Erhalt der Enzymaktivität in gebundener Form hergestellt werden. Dabei ist z.B. das erfindungsgemäße Polypeptid über Chelatkomplexe an Metalle z.B. Nickel
20 gebunden oder aufgrund anderer Bindungsprinzipie an eine Matrix gebunden.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können durch Modifikation ihrer Aminosäuresequenz substituiert, deletiert oder addiert sein. Die Modifikation kann durch übliche Verfahren eingeführt werden, z.B. durch zielgerichtete Mutagenese (*site directed mutagenesis*) oder
25 evolutives Proteindesign. Die Polypeptide können ferner ein verändertes pH- oder Temperatur-Optimum oder eine modifizierte Substratspezifität besitzen. Durch die veränderte Substratspezifität kann die Substratakzeptanz variieren, so daß neuartige Glykoside hergestellt werden können.

30 Die mit den erfindungsgemäßen Polypeptiden und/oder dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Glykoside können in kosmetischen oder pharmazeutischen Zubereitungen verwendet werden.

Beispiele:

1. Isolierung und Aufreinigung der Glykosyltransferase

5 Eine Zellsuspension von *R. serpentina* wurde in 1 l Erlenmeyer-Kolben auf Linsmaier und Skoog Medium (Linsmaier E.M., Skoog F., (1965), Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 18:100-127) 10 Tage unter kontinuierlichem Lichteinfluß (600 Lux) und Schütteln (100 rpm) bei 24 °C kultiviert. Nach Ernte der Zellen durch Filtration wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -26°C gelagert.

10

Die Aufreinigungsschritte wurden alle bei 4°C durchgeführt. Zu 5,5 kg gefrorenen Zellen von *Rauwolfia serpentina* wurden 2,5 l Puffer A (0,15 M Tris-HCl, 20 mM β -Mercaptoethanol (EtSH) pH 7,5) gegeben. Die Mischungs-Aliquots wurden je 1 min homogenisiert (Ultraturax), dann filtriert (cheese cloth). Die anfallende Lösung wurde 30 min bei 10.000 x g zentrifugiert.

15

Mit dem Protein im Überstand (7,1 l) wurde eine fraktionierte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung durchgeführt. Das bei 30-70 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällte Protein wurde nach 30 min Zentrifugation bei 10.000 x g gesammelt und in 500 ml Puffer A gelöst und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde zweimal 8 Stunden gegen 10 l Puffer B (20 mM Tris-HCl, 10 mM EtSH, pH 7,5) dialysiert. Nach 20 min Zentrifugation bei 10.000 x g und erneutem Lösen des Präzipitâts wurde eine lösliche

20

Proteinfraktion erhalten (750 ml, 7,4 mg/ml).

Die erhaltene Proteinlösung wurde durch Anionenaustauscher-Chromatographie weiter aufgereinigt (Flußrate 10 ml/min, fast-flow DEAE-Sepharose Säule 20,3 x 5 cm, Volumen von 400 ml, XK50/30-Säule, Pharmacia), welche mit Puffer B equilibriert wurde. Nach Waschen der

25 Säule mit einem Säulenvolumen (400 ml) Puffer B und einem Säulenvolumen 0,03 M KCl in Puffer B wurde das Enzym mit einem linearen KCl-Gradienten (4 Säulenvolumen, 0,03-0,15 M KCl), hergestellt aus Puffer B und C (Puffer B mit 1 M KCl) eluiert. Die Enzymaktivität wurde bei etwa 0,1 M KCl gemessen. Fraktionen mit Transferaseaktivität wurden gepoolt und für den nächsten Aufreinigungsschritt durch Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf 250 mM konzentriert.

30

Die so erhaltene Proteinlösung wurde mit einer Flußrate von 5 ml/min durch eine fast-flow Phenyl-Sepharose Säule (38 x 2,6 cm, Volumen von 200 ml, XK26/40-Säule, Pharmacia) gepumpt. Die Säule wurde mit Puffer D (Puffer B mit 250 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) equilibriert. Nach Waschen der Säule mit einem Säulenvolumen (200 ml) Puffer D wurde das Enzym mit einem

Gradienten von 250 bis 0 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (aus Puffer D und B) eluiert. Die Fraktionen mit mehr als 9,86 nkat/mg wurden kombiniert (140 ml) und über Nacht gegen 3 l Puffer H (20 mM Tris-HCl, 10 mM EtSH, pH 7,5, 20% PEG 20.000) dialysiert (Restvolumen 1 ml).

- 5 Die aufkonzentrierte Proteinlösung wurde mit Puffer E (10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 10 mM EtSH, pH 7,5) auf ein Volumen von 56 ml verdünnt und auf eine Macro-PrepTM Ceramic Hydroxylapatit (BioRad) Säule (1,5 x 1,6 cm, Volumen von 3 ml, XK16/20-Säule, Pharmacia) aufgegeben, die zuvor mit Puffer E equilibriert wurde. Nach Waschen der Säule mit sieben Säulenvolumen (21 ml) Puffer E wurden die Proteine mit einem Kalium-Phosphat-Puffer-Gradienten (10 bis 400 mM, 35 Säulenvolumen, 105 ml) aus Puffer E und F (0,4 M $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 10 mM EtSH, pH 7,5) eluiert. Drei Fraktionen (15 ml) mit mehr als 4 nkat/mg wurden kombiniert und über Nacht gegen 2 l Puffer B dialysiert.

15 Die dialysierte Enzymlösung (55 ml) wurde über eine Mono P HR 5/20 Säule (Pharmacia) mit 0,5 ml/min gepumpt, die zuvor mit Puffer B equilibriert wurde. Die Proteine wurden mit 30 ml Puffer G (Polybuffer 74, 1:20 verdünnt, 10 mM EtSH, pH 4,0) durch Aufspannen eines linearen pH-Gradienten von pH 7,5 bis 4,0 fraktioniert. Die Transferase-Aktivität wurde bei einem pH-Wert von etwa 5,3 gemessen.

20 TABELLE 1

| Schritt | Volumen | Gesamt-Protein | Gesamt-Aktivität | Rückgewinnung | Spezifische Aktivität | Anreicherung |
|---|---------|----------------|------------------|---------------|-----------------------|--------------|
| | ml | mg | nkat | % | nkat/mg | x-fach |
| Rohextrakt | 7100 | 7650 | 510 | 100 | 0,067 | 1 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30 – 70 %) | 750 | 5520 | 443 | 86,6 | 0,08 | 1,2 |
| DEAE-Sepharose | 300 | 340 | 365 | 71,6 | 1,07 | 16 |
| Phenyl-Sepharose Cl-4b | 140 | 34 | 120 | 23,5 | 3,53 | 52,7 |
| Hydroxylapatit | 15 | 2,9 | 13,8 | 2,7 | 4,75 | 70,1 |
| Mono P | 1,5 | 0,095 | 2,5 | 0,5 | 26,32 | 390 |

2. Klonierung

Gesamt-RNA aus *R. serpentina* wurde mit der Lithiumchlorid-Methode präpariert. Hierfür wurde 5 g in Stickstoff schockgefrorenes Gewebe in 15 ml Extraktionspuffer TLE (0,2 M Tris-HCl, 0,1 M LiCl, 5 mM EDTA, 1 % SDS) homogenisiert und mit 5 ml TLE-equilibriertem Phenol versetzt. Nach 10 sekundigem Aufschluß im Ultraturax wurden 5 ml Chloroform zugesetzt und erneut homogenisiert. Die Lösung wurde zur Zelllyse 20 min bei 50°C im Wasserbad inkubiert und anschließend 20 min bei 8.000 x g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgezogen, in ein neues Zentrifugengefäß überführt und so oft mit TLE-gesättigtem Phenol und Chloroform (je 5 ml) extrahiert, bis an der Grenzfläche kein Protein mehr ausfiel. Als abschließender Schritt wurde nochmals mit 10 ml Chloroform extrahiert. Die abgetrennte wässrige Phase wurde nun mit einem Drittel ihres Volumens (ca. 5 ml) 8 M LiCl versetzt. Die Fällung der RNA erfolgte über Nacht bei 4°C.

Durch 20 min Zentrifugation bei 30.000 x g und 4°C bildete sich ein glasiger Niederschlag, der mit 1 ml 2 M LiCl-Lösung gewaschen und 5 min bei 8.000 x g und 4°C zentrifugiert wurde. Der Niederschlag wurde vorsichtig in 600 µl sterilem Wasser gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und abermals mit 200 µl 8 M LiCl-Lösung versetzt. Nach zweistündiger Inkubation bei 4°C wurde die RNA 20 min bei 15.000 x g und 4°C abzentrifugiert, der Niederschlag mit 2 M LiCl-Lösung 5 min zentrifugiert, bei 15.000 x g bei 4°C gewaschen und anschließend in 200 µl sterilem Wasser gelöst.

Anschließend wurde eine einstündige Ethanolfällung bei -80°C nach Zugabe von 20 µl 3 M NaOAc und 550 µl Ethanol durchgeführt. Die nach 15 min Zentrifugieren bei 15.000 x g und 4°C erhaltene RNA wurde in 100 µl sterilem Wasser gelöst und der RNA-Gehalt bestimmt.

Einzelsträngige cDNA, die in der PCR als Template verwendet werden sollte, ließ sich aus Gesamt-RNA Präparationen herstellen. Als RNA-abhängige DNA-Polymerase wurde M-MLV Reverse Transkriptase eingesetzt.

30

Reaktionsansatz der Reverse-Transkriptase-Reaktion:

| | |
|-----------------------------|-------|
| RNA (in max. 10 µl Wasser): | 10 µg |
| Oligo dT-Primer | 1 µl |

| | |
|---------------|------|
| 5× Puffer | 4 µl |
| DTT (0,1 M) | 2 µl |
| dNTP's (2 mM) | 2 µl |

- 5 Der Reaktionsansatz wurde für 5 min auf 65°C erhitzt und dann auf 37°C abgekühlt. Erst jetzt erfolgte die Zugabe von 1 µl Enzymlösung (200 U). Die Reaktion verlief über eine Stunde bei 37°C und wurde durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C gestoppt. Die cDNA wurde anschließend zur Amplifizierung eines Teils der Arbutin-Synthase-cDNA verwendet. Als Primer wurden degenerierte Oligonucleotide von den Peptidfragmenten 7b und 30 abgeleitet und
10 synthetisiert.

HGT 7b rev:

5'-ATA IGC IAA IGC ATC ATT CTG ATT CTG-3' (SEQ ID NO:3)
G G T G T

15

HGT 30 for

5'-TAC AGI CTI GCI GAA GGI ATA ATG GTN AA-3' (SEQ ID NO:4)
T C T G C
T

20

Die Bedingungen der PCR waren wie folgt:

| | |
|-----------------------------------|----------------------|
| dNTP-Mix (2 mM) | 1 µl |
| PCR-Puffer (10×) | 2 µl |
| MgCl ₂ -Lösung (50 mM) | 1 µl |
| 25 Primer (200 pmol/µl) | je 1 µl |
| cDNA | 1 µl des RT-Ansatzes |
| Taq-Polymerase (10 U/µl) | 0,2 µl |
| Wasser | ad 20 µl |

- 30 Das amplifizierte Fragment wurde elektrophoretisch getrennt und aus dem Gel eluiert. Nach radioaktiver Markierung mit ³²P-ATP (Random Priming, Gibco) wurde das Fragment als Sonde zum Durchmustern einer cDNA-Bibliothek aus *R. serpentina* eingesetzt. Die cDNA-Bibliothek wurde von mRNA einer sechs Tage alten *R. serpentina* Zellkultur mit dem Lambda ZAP System der Firma Stratagene hergestellt.

Positive Klone wurden isoliert und sequenziert. Zur Expression der isolierten Klone in *E. coli* wurden zwei Vektoren verwendet. Das Plasmid pSE280 (Invitrogen) diente zur Expression des Enzyms ohne zusätzliche Aminosäuren, der Vektor pQE60 (Qiagen) zur Produktion eines Fusionsproteins (6xHis-Tag). Zur Klonierung wurde die komplette kodierende Sequenz der cDNA über PCR amplifiziert. Als Polymerase wurde die Vent-Polymerase (NEB) verwendet.

Klonierung in pSE280: (NcoI und XhoI)

Primer HGTpSErev: 5' -GACTCTCGAGTTATGTACTGGAAATTTTG-3' (SEQ ID NO:5)

10 Primer HGTpSEfor: 5' -CGAAACCATGGAGCATACACCTCACA-3' (SEQ ID NO:6)

Bedingungen: 5 min 94°C; 30 Zyklen 94°C für 1 min, 55°C für 1,5 min, 72°C für 2 min; abschließend 5 min 72°C.

Klonierung in pQE60: (NcoI und BglII)

15 Primer HGTpQE60rev: 5' -CTTCGAGATCTTGTACTGGAAATTTTGTTTC-3' (SEQ ID NO:7)

Primer HGTpQE60 for: (wie HGTpSEfor)

Bedingungen: 5 min 94°C; 5 Zyklen 94°C für 1 min, 45°C für 1,5 min, 72°C für 2 min; 30 Zyklen 94°C für 1 min, 55°C für 1,5 min, 72°C für 2 min; abschließend 5 min 72°C.

20 Die PCR-Produkte wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und in die entsprechenden Vektoren ligiert. Transformation erfolgte in TOP 10-Zellen, bei pQE60 zusätzlich in M15 Zellen.

3. Identität zu bereits bekannten Glykosyltransferasen

25

Die Sequenzierung der Glykosyltransferase-cDNA ergab einen offenen Leserahmen von 1410 bp entsprechend 470 Aminosäuren. Das errechnete Molekulargewicht beträgt 51.791,05 Da, der berechnete pI 5,83.

30 Identitätsvergleiche zu bekannten Aminosäuresequenzen zeigten gegenüber anderen Glykosyltransferasen geringe Identität. Die höchste Übereinstimmungen betragen 60,435 % zu einer Glykosyltransferase aus *Arabidopsis thaliana*. Die Identitätsvergleiche wurden mit dem Similaritätsalgorithmus FASTA3_t (W.R. Pearson & D.J. Lipman, PNAS (1988), 85:2444-2448) (database: swall; Sequenzlänge 470aa) durchgeführt. Identische Aminosäuren sind sowohl

gleiche als auch solche mit ähnlichen Eigenschaften.

TABELLE 2

| Enzym (Organismus) | Peptid (aa) | Identität (%) |
|--|-------------|---------------|
| UTP-GLUCOSE GLUCOSYLTRANSFERASE (ARABIDOPSIS THALIANA) | 464 | 60.435 |
| FLAVONOL 3-O-GLUCOSYLTRANSFERASE 5 (MANIHOT ESCULENTA) | 474 | 41.139 |
| UTP-GLUCOSE GLUCOSYLTRANSFERASE LIKE PROTEIN (ARABIDOPSIS THALIANA) | 467 | 43.041 |
| F9D12.4 PROTEIN. (ARABIDOPSIS THALIANA) | 458 | 40.830 |
| PUTATIVE UTP-GLUCOSE GLUCOSYLTRANSFERASE (ARABIDOPSIS THALIANA) | 470 | 41.489 |
| PUTATIVE UTP-GLUCOSE GLUCOSYLTRANSFERASE. ARABIDOPSIS THALIANA | 468 | 38.248 |
| FLAVONOL 3-O-GLUCOSYLTRANSFERASE 1 (MANIHOT ESCULENTA) | 452 | 33.850 |
| ZEATIN O-GLUCOSYLTRANSFERASE. (PHASEOLUS LUNATUS) Q9ZSK5 | 463 | 31.749 |
| IMMEDIATE-EARLY SALICYLATE-INDUCED GLUCOSYLTRANSFERASE (NICOTIANA TABACUM) | 486 | 29.630 |

5

4. Mikrobielle Glykosidsynthese mit rekombinanten *E. coli* (integrierte Glykosyltransferase-cDNA).

- 10 Top10 *E. coli* wurden mit dem Plasmid pSE280 in LB-Amp-Medium (1 l Erlenmeyerkolben, Reaktionsvolumen von 200 ml, 40 h), in dem 200 mg/l Hydrochinon vorlagen, bei verschiedenen Temperaturen (25°C, 30°C, 37°C) kultiviert. Das Wachstum des Mikroorganismus wurde durch die Gegenwart von Hydrochinon bei keiner der gewählten Temperaturen eingeschränkt. Ebenso
- 15 verhielt es sich beim Upscale in 50 l Reaktoren mit Sauerstoff-, Rühr- und pH-Wert-Kontrolle, wo auch weitaus höhere Hydrochinonkonzentrationen von bis zu 10 % (w/w) toleriert wurden.

Die *E. coli* Zellen TOP10 (pSE280) als auch M15 (pQE60) exkretierten das hergestellte Arbutin

ins Medium, in dem es mittels HPLC nachgewiesen wurden. Die Arbutin-Ausbeute betrug nach 24 Stunden bis zu 42% und nach 35 Stunden bis zu 51%. Die maximalen Enzymaktivitäten betrugen bei *E. coli* M15 (pQE60) über 750 nkat/l.

5. Synthese von Arbutin mittels Matrix-gebundener Arbutin-Synthase

Die in *E. coli* Zellen M15 (pQE60) produzierte Arbutinsynthase wurde auf einer Ni-NTA Superflow Säule (Volumen 2 ml) gebunden. Zugabe von Hydrochinon und UDP-Glucose variabler Konzentration in geeigneten Puffern ergab bei Raumtemperatur (23°C) und einer applizierten Flußrate von 3 ml/h eine Ausbeute von 100% Arbutin. Inaktiv gewordene Säulen können durch Lagerung in 100 mM TRIS-HCl pH 7,5 und 10 mM Mercaptoethanol bei 4°C über einige Stunden problemlos wieder reaktiviert werden.

6. Substratspezifität

Die in Beispiel 4 aufgeführten rekombinanten *E. coli* wurden unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 4 mit den in Tabelle 3 aufgeführten Substraten kultiviert. Die relative Aktivität der Arbutin-Synthase für die einzelnen Substrate ist in Tabelle 3 gezeigt.

TABELLE 3

| Substrat | Relative Aktivität (%) |
|---------------|------------------------|
| Hydrochinon | 100 |
| Vanillin | 24.7 |
| p-Nitrophenol | 6.7 |
| β-Naphtol | 5.4 |
| Thymol | 4.6 |
| Methoxyphenol | 2.2 |
| Resorcin | 2.2 |
| Phenol | 1.2 |

7. Messung der Arbutin-Synthase-Aktivität

Das im Kulturmedium vorhandene Arbutin wurde mittels HPLC nachgewiesen. Die verwendete Säule war LiChro CART 250-4 mit LiChrospher 60 RP-select B (5 µm) von Merck KGaA. Das Fließmittel (Acetonitril : H₂O, 2 : 98 (v:v), pH 2,3 mit H₃PO₄ eingestellt) wurde isokratisch mit
5 einer Flußrate von 2 ml/min über die Säule gepumpt. Die Retentionszeiten betrugen für Arbutin 3,0-3,8 und Hydrochinon 4,0-4,8.

Patentansprüche

1. Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1 oder deren Derivat oder Fragment oder die Variante der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1 oder ein Derivat oder Fragment der Variante, codierend ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Arbutin-Synthase.
5
2. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1, wobei die Nukleinsäuresequenz der Variante oder ein Derivat oder Fragment der Variante mit der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1 hybridisiert.
10
3. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Nukleinsäuresequenz der Variante oder ein Derivat oder Fragment der Variante mit der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert.
- 15 4. Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Nukleinsäuresequenz der Variante aus *Rauwolfia serpentina*, Ericaceae oder Saxifragaceae stammt.
5. Polypeptid, codiert von der Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4.
- 20 6. Polypeptid nach Anspruch 5, wobei das Polypeptid die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 oder dessen Derivat oder Fragment umfaßt.
7. Polypeptid gemäß Anspruch 6, wobei die Aminosäuresequenz des Polypeptids oder dessen Derivats oder Fragments zur Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 eine Identität von
25 60 % oder mehr, oder von 80 % oder mehr, oder von 90 % oder mehr besitzt.
8. Vektor, umfassend eine Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4.
9. Transformierte Zelle, umfassend eine Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1
30 bis 4 oder umfassend den Vektor nach Anspruch 8.
10. Zelle nach Anspruch 9, wobei die Zelle ein Mikroorganismus oder eine pflanzliche oder eine tierische Zelle ist.

11. Zelle nach Anspruch 10, wobei der Mikroorganismus ein Bakterium oder eine Hefe, die pflanzliche Zelle eine Algenzelle und die tierische Zelle eine Insektenzelle ist.

5 12. Zelle nach einem der Ansprüche 9 bis 11, wobei die Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4 stabil ins Genom integriert ist.

13. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 5 bis 7, umfassend die Schritte:

- 10 a) Transformieren einer Zelle mit einer Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
b) Kultivieren und Vermehren der Zelle aus Schritt a),
c) Isolieren der Zellen aus Schritt b),
d) Isolieren des exprimierten Polypeptids nach einem der Ansprüche 5 bis 7 aus den
15 Zellen aus Schritt c).

14. Verfahren zur Herstellung von Glykosiden, dadurch gekennzeichnet, daß ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 5 bis 7 auf ein oder mehrere alkoholische Substrate und ein oder mehrere Kohlenhydrate einwirkt.

20

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei das alkoholische Substrat ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend unverzweigte oder verzweigte, einfach oder mehrfach ungesättigte Alkyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkylalkyl-, Aralkyl- oder Arylalkohole mit 1 bis 26 C-Atomen und 0 bis 10 Heteroatomen und gegebenenfalls Substituenten, insbesondere Hydroxy-, Halogen- Amino- oder
25 Nitro-Reste, an den 1 bis 26 C-Atomen und/oder 0 bis 10 Heteroatomen.

16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, wobei das alkoholische Substrat ein aromatischer Alkohol ist.

30 17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei der aromatische Alkohol ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Hydrochinon, Vanillin, p-Nitrophenol, β -Naphthol, Thymol, Methoxyphenol, Resorcin, Phenol, Hydroxyacetophenon, Niclosamid, Dimethoxymethylhydrochinon, Flavonoide, Flavone, Catechol, Catechine, Anthocyanidine, Gallussäure und Tannine.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17, wobei das Kohlenhydrat ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Glucose, Fructose, Galactose, Mannose, Lactose und Maltose.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 18, wobei das Polypeptid *in vivo* oder *in*
5 *vitro* auf das alkoholische Substrat und das Kohlenhydrat einwirkt.

20. Verwendung des nach dem Verfahren nach Anspruch 14 bis 19 hergestellten Glykosids in kosmetischen oder pharmazeutischen Zubereitungen.

FIG. 1

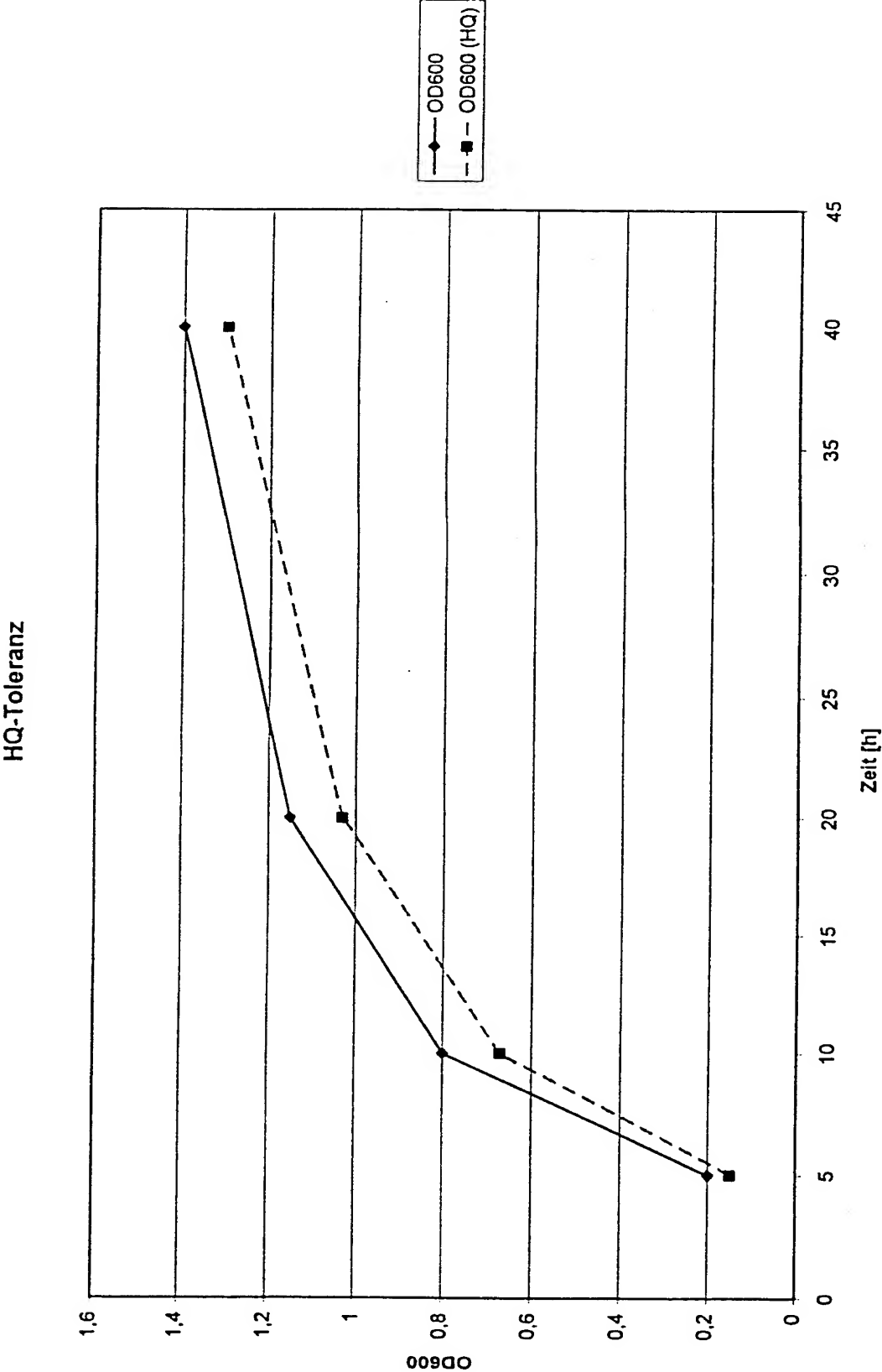
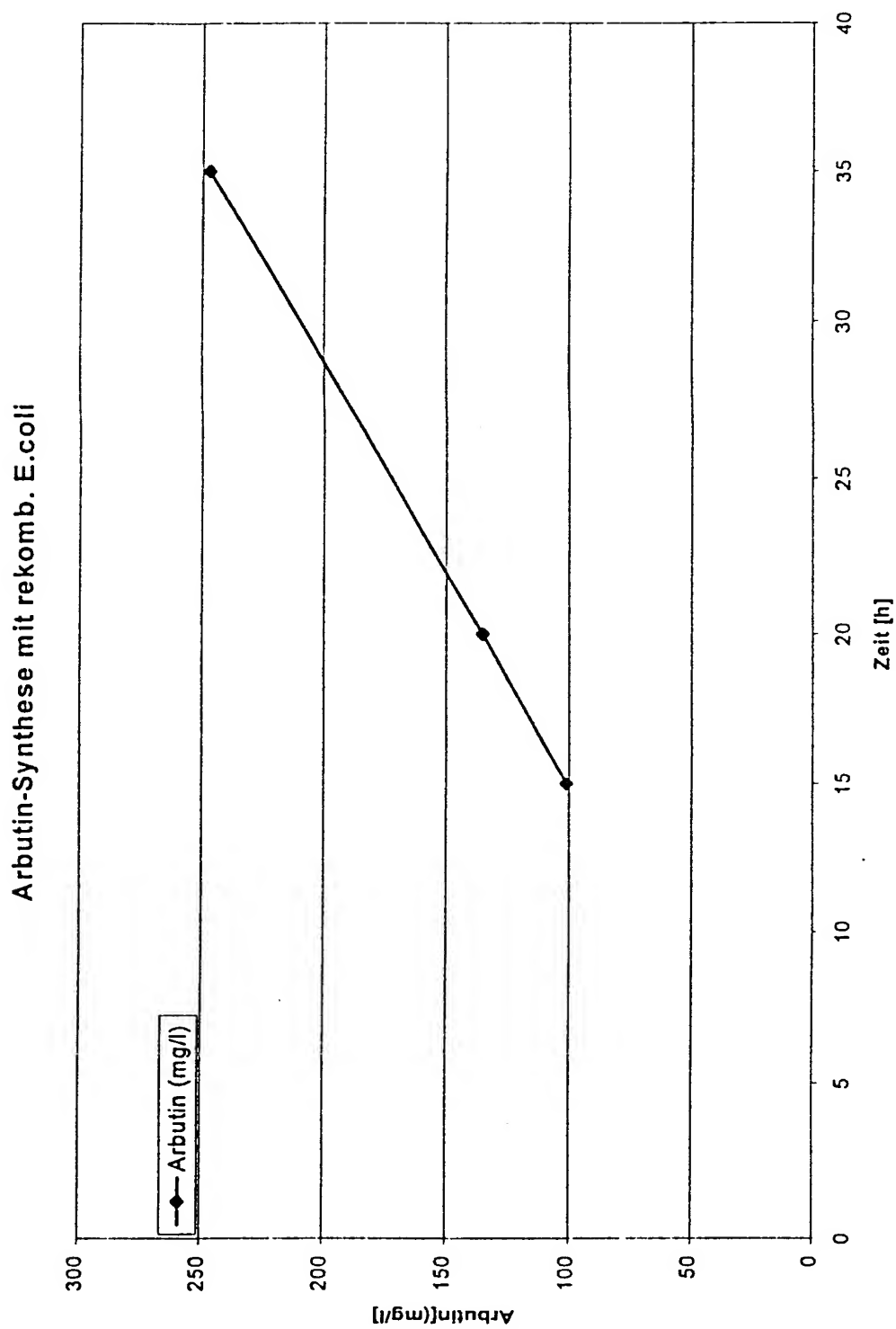


Fig. 2



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Henkel KGaA

5

<120> Neue Glykosyltransferase, ihre Herstellung und
Verwendung

<130> HEN-001 PCT

10

<140> xx

<141> 2000-07-27

<150> DE 199 35 140.6

15

<151> 1999-07-27

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

20

<210> 1

<211> 1413

<212> DNA

<213> Rauvolfia serpentina

25

<400> 1

```
atggagcata cacctcacat tgctatggtg cccactccgg gaatgggtca tctgatcccc 60
ctcgttgagt tcgctaaacg actcgtcctc cgtcacaact ttggcgtcac ttttattatc 120
ccaaccgatg gacctctccc taaagcacag aagagttttc ttgatgctct tcccgccggc 180
30 gtaaactatg ttcttcttcc cccggtaagc ttcgacgact taccgctga tgtaggata 240
gagaccgta tttgtctcac catcactcgc tctctcccggt ttgttcggga tgccgttaag 300
actctactcg ccaccaccaa gttagctgct ctagtgggtg atcttttcgg caccgatgca 360
tttgatggtg caattgagtt caaggtctcc ccttatatct tctatcctac gacggccatg 420
tgctgtctc ttttctttca cttgcctaag cttgatcaaa tgggtgtcctg cgaatataga 480
35 gacgtcccag aaccattgca gattccagga tgcataccca ttcacgggaa ggattttctt 540
gaccagctc aggatcgcaa aaatgatgcc tacaaatgcc tccttcacca ggccaagaga 600
taccgggttag ctgaggggtat catgggtcaac accttcaacg acttgagacc aggaccctta 660
aaagctttgc aggaggaaga ccagggttaag ccaccggttt atccgatcgg accactcatc 720
agagcggatt caagcagcaa ggtcgacgac tgtgaatggt tgaaatggct agatgaccag 780
40 ccacgtgggt cgggttctggt tattttcttc ggaagcgggt gggcagtctc ccataatcag 840
ttcattgagc tagctttggg attagagatg agcgagcaaa gattcttgtg ggttgtccga 900
```

agcccaaagt ataaaattgc gaatgcaacg tatttcagca ttcaaaatca gaatgatgct 960
 cttgcatatc tgccagaagg attcttggag agaaccaagg ggcgttgtct tttgggtcccg 1020
 tcttggggcgc cgcagactga aattcttagc catgggtcca cgggtggatt tctaaccac 1080
 tgcgggtgga actctattct tgagagtgtg gttaatgggg tgccgctaatt tgcttggcct 1140
 5 ctttatgcag agcaaaagat gaacgccgta atgttgacgg agggctctta agtggccctg 1200
 aggccaaaag ccggtgaaaa tggcttgata ggccgagtcg agatcgccaa tgccgttaag 1260
 ggcttaatgg agggagagga aggaaagaag ttccgcagca caatgaaaga cctaaaagat 1320
 gcggcatcga gggcgctaag tgatgacggg tcttcgacaa aagcactcgc tgaattggct 1380
 tgcaagtggg agaacaaaat ttccagtaca taa 1413

10

<210> 2

<211> 470

<212> PRT

15 <213> *Rauvolfia serpentina*

<400> 2

Met Glu His Thr Pro His Ile Ala Met Val Pro Thr Pro Gly Met Gly

1

5

10

15

20

His Leu Ile Pro Leu Val Glu Phe Ala Lys Arg Leu Val Leu Arg His

20

25

30

Asn Phe Gly Val Thr Phe Ile Ile Pro Thr Asp Gly Pro Leu Pro Lys

25

35

40

45

Ala Gln Lys Ser Phe Leu Asp Ala Leu Pro Ala Gly Val Asn Tyr Val

50

55

60

30

Leu Leu Pro Pro Val Ser Phe Asp Asp Leu Pro Ala Asp Val Arg Ile

65

70

75

80

Glu Thr Arg Ile Cys Leu Thr Ile Thr Arg Ser Leu Pro Phe Val Arg

85

90

95

35

Asp Ala Val Lys Thr Leu Leu Ala Thr Thr Lys Leu Ala Ala Leu Val

100

105

110

Val Asp Leu Phe Gly Thr Asp Ala Phe Asp Val Ala Ile Glu Phe Lys

40

115

120

125

Val Ser Pro Tyr Ile Phe Tyr Pro Thr Thr Ala Met Cys Leu Ser Leu
 130 135 140

Phe Phe His Leu Pro Lys Leu Asp Gln Met Val Ser Cys Glu Tyr Arg
 5 145 150 155 160

Asp Val Pro Glu Pro Leu Gln Ile Pro Gly Cys Ile Pro Ile His Gly
 165 170 175

10 Lys Asp Phe Leu Asp Pro Ala Gln Asp Arg Lys Asn Asp Ala Tyr Lys
 180 185 190

Cys Leu Leu His Gln Ala Lys Arg Tyr Arg Leu Ala Glu Gly Ile Met
 195 200 205

15 Val Asn Thr Phe Asn Asp Leu Glu Pro Gly Pro Leu Lys Ala Leu Gln
 210 215 220

Glu Glu Asp Gln Gly Lys Pro Pro Val Tyr Pro Ile Gly Pro Leu Ile
 20 225 230 235 240

Arg Ala Asp Ser Ser Ser Lys Val Asp Asp Cys Glu Cys Leu Lys Trp
 245 250 255

25 Leu Asp Asp Gln Pro Arg Gly Ser Val Leu Phe Ile Ser Phe Gly Ser
 260 265 270

Gly Gly Ala Val Ser His Asn Gln Phe Ile Glu Leu Ala Leu Gly Leu
 275 280 285

30 Glu Met Ser Glu Gln Arg Phe Leu Trp Val Val Arg Ser Pro Asn Asp
 290 295 300

Lys Ile Ala Asn Ala Thr Tyr Phe Ser Ile Gln Asn Gln Asn Asp Ala
 35 305 310 315 320

Leu Ala Tyr Leu Pro Glu Gly Phe Leu Glu Arg Thr Lys Gly Arg Cys
 325 330 335

40 Leu Leu Val Pro Ser Trp Ala Pro Gln Thr Glu Ile Leu Ser His Gly
 340 345 350

4

Ser Thr Gly Gly Phe Leu Thr His Cys Gly Trp Asn Ser Ile Leu Glu
355 360 365

5 Ser Val Val Asn Gly Val Pro Leu Ile Ala Trp Pro Leu Tyr Ala Glu
370 375 380

Gln Lys Met Asn Ala Val Met Leu Thr Glu Gly Leu Lys Val Ala Leu
385 390 395 400

10 Arg Pro Lys Ala Gly Glu Asn Gly Leu Ile Gly Arg Val Glu Ile Ala
405 410 415

15 Asn Ala Val Lys Gly Leu Met Glu Gly Glu Glu Gly Lys Lys Phe Arg
420 425 430

Ser Thr Met Lys Asp Leu Lys Asp Ala Ala Ser Arg Ala Leu Ser Asp
435 440 445

20 Asp Gly Ser Ser Thr Lys Ala Leu Ala Glu Leu Ala Cys Lys Trp Glu
450 455 460

Asn Lys Ile Ser Ser Thr
465 470

25

<210> 3

<211> 27

30 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
35 Sequenz:Oligonukleotid

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)

40 <223> Inosin

5

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)

<223> Inosin

5

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)

<223> Inosin

10

<400> 3

rtangcnarn gcrtcrttyt grttytg

27

15 <210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

20 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotid

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (6)

<223> Inosin

<220>

30 <221> misc_feature

<222> (9)

<223> Inosin

<220>

35 <221> misc_feature

<222> (12)

<223> Inosin

<220>

40 <221> misc_feature

<222> (18)

<223> Inosin

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (27)

<223> Any

<400> 4

taymgnytn g cngarggnat hatggtnaa

29

10

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

15 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotid

20

<400> 5

gactctcgag ttatgtactg gaaattttg

29

25 <210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

30 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotid

<400> 6

35 cgaaaccatg gagcatacac ctcaca

26

<210> 7

<211> 30

40 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

7

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotid

5

<400> 7

cttcgagatc ttgtactgga aattttggtc

30

10